Chinese Agron. J. 1: 169-184 (1991)
Chinese Society of Agronomy © 1991

王米未成熟胚培養
(二)癒合組織的生長及分化

廖成康[1] 蔡新聲[2]

[1]國立台灣大學農藝系 [2]台灣省農業試驗所農藝系

摘要：組織培養技術，應用於作物品種改良，其前題是必須能獲得大量之再生植株，因此建立一套具有高分化能力的培養方法極爲重要。本試驗以玉米未成熟胚爲培植體，探討影響癒合組織形成的因子。結果得知以三星期間隔繼代培養癒合組織，較能維持癒合組織的生長速率及避免癒合組織褐化。培養基中加入200mg／1 水解酪蛋白（casein hydrolysate），200mg／1 酵母抽出物（yeast extract）或1.38 g／1 脯氨酸（L-proline）可增進癒合組織的生長，而麥芽抽出物（malt extract）則無明顯效果。在含有MS基本鹽類及3％蔗糖之分化培養基中，加上NAA(α－naphthalene-acetic）／BA（6－benzylamino purine）、NAA／kinetin（6－furfurylamino purine）及 GA_3（gibberellic acid）等組合之植物生長調節劑，不但不能提高癒合組織分化植株之能力，反使分化效果大大降低。高濃度 auxin（超過5mg／1 dicamba（3, 6－dichloroanisic acid）or 2 mg／1 2, 4－D（2, 4－dichlorophenoxyacetic acid）所誘導的癒合組織，分化植株之能力較差。U-67甜玉米未成熟胚癒合組織經三次（每次間隔三星期）之繼代培養後，植株誘導率爲20％，二十次繼代培養後之植株分化率仍可達10％，顯示此種癒合組織是進行細胞培養及原生質體分離、再生之極佳材料。由 U-67甜玉米未成熟胚癒合組織所誘導約200棵之植株，經移植於温室中種植至成熟，並經套袋自花授粉後結實，結果發現許多體細胞突變體（somaclones），明顯的形態變異有植株矮化、早熟、皺葉或捲葉、缺少雄穗或雌穗、缺乏葉綠素、雌穗著生於植株頂端、雌雄同穗及雄不捻等個體。

關鍵語：玉米、未成熟胚培養、分化、體細胞突變體。

Immature embryo culture of *Zea mays* L. II. The growth and differentiation of callus

C. K. Liao[1] and H. S. Tsay[2]

[1]Department of Agronomy, National Taiwan University. Taipei. Taiwan, Republic of China and [2]Department of Agronomy, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, Republic of China.

Abstract. The application of tissue culture technologies on crop improvement depends on the production of a large number of regenerated plants. To meet such purpose, it is important to deveop a system which enables the cultured explants to show a high differentiation ability. In this paper, factors affecting the maintenance and differentiation of callus from immature maize embryos were studied. The results shows a time interval of three weeks between subcultures of immature embryo-derived callus was appropriate in terms of maintaining the growth rate (fresh weight increase) and preventing from browning of the callus. Fresh weight of immature embryo-derived callus of maize inbred U-67 was increased by the addition of 200 mg/l casein hydrolysate, 200 mg/l yeast extract or 1.38 g/l L-proline to the medium. Malt extract had no effect in this aspect. The addition of varying concentrations of NAA (α-naphthaleneacetic acid)/BA (6-benzylamino purine), NAA/kinetin (6-furfurylamino purine) or GA_3 (gibberellic acid) to the MS regeneration medium showed reversed effect on the differentiation ability of the callus. Callus induced under high concentrations of auxins (e.g., over 5 mg/l dicamba (3,6-dichloroanisic acid) or 2 mg/l 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)) supplemented to MN-6 medium showed poor regeneration ability after transferring to MS medium for organ differentiation. Twenty percent of plant regeneration rate was recorded from immatre embryo-derived callus was subcultured for three generations (3 weeks interval for each generation). The plant regeneration ability was maintained at 10% even the callus was subcultured for 20 generations. Thus we concluded that the immature embryo-derived callus could be used as a good materials for establishment of cell suspension, protoplast isolation and plant regeneration. About 200 regenerated plants from immature embryo-derived callus of U-67 were raised to maturity in the greenhouse. Some plants were morphologically abnormal, e. g., dwarf plants with early maturity, curly or wrinkled leaves, absence of tassel and/or ear, terminal ear, development of female flowers in the tassels (tassel seed), chlorophyll deficiency and male sterility etc.

Key words: *Zea mays*, Immature embryo culture, Differentiation, Somaclones.

前　　言

利用組織培養過程中選拔自然產生的體細胞變異體（somaclonal variation），進行禾穀類作物品種改良，是目前生物技術研究與應用發展的重點之一。經過去二十年來的努

力，禾穀類作物已可經由不同的培植體（explant）及不同的培養方式得到再生植株，但其分化率仍偏低。一般禾穀類作物未成熟胚培養所誘導的癒合組織有兩種形態，其中一種爲 embryogenic callus，是指癒合組織在適當的分化培養基中，可經由器官分化（organogenesis）或胚形成（embryogenessis）途徑再生成植株；而另一種爲 non-embryogenic callus，是由長管狀的細胞組成，不容易再生成植株。因此，欲提高植株再生率，誘導 embryogenic callus 的形成極爲重畏。玉米未成熟胚誘導的癒合組織，雖可經由胚形成途徑再生成植株（Lu et al. 1982, Nabors et al. 1983, Vasil and Vasil 1981），但這些 embryogenic callus 於繼代培養過程中，生長緩慢，不容易長時期培養。因此如何使 embryogenic callus 在繼代培養過程中，維持高分化能力是本研究探討的重點之一，其目的在瞭解玉米未成熟胚培養產生高分化能力癒合組織所需的條件，並進一步提高植株再生的能力。

材料與方法

試驗材料

本試驗所選用的材料爲雙交種台南11號的父本 2027－3－5×LY 22－4,及具有 sugary-1 突變基因的超甜玉米自交系 U-67，其田間栽培方法如 Liao and Tsay （1991）所述。

未成熟胚的取樣、消毒及接種

田間植株於開花、吐絲期分別套袋，將人工自花授粉後十天的幼果穗取回，在無菌箱中除去苞葉，以0.5％次氯酸鈉超音波震盪消毒20分鐘，然後用無菌水沖先3次後，再以解剖刀取出未成熟胚，以胚表面接觸培養基方式接種，每根含10mℓ 培養基之試管接種5個未成熟胚。

癒合組織的誘導培養基

誘導玉米未成熟胚形成癒合組織的培養基爲 N_6（Chu et al. 1975）培養基的無基鹽類及 MS（Murashige and Skoog 1962）培養基的有機成份，其中維它命 B_1（Thiamine HCℓ）提高至4㎎／1，外加500㎎／1水解酪蛋白，1.38 g ／1脯氨酸，3％蔗糖及0.8％瓊脂（Phytagar），簡稱 NM-6。本研究探討癒合組織生長之試驗，採用含有 3㎎／1 dicamba 之 MN-6基本培養基。而分化培養基則採用含有3％蔗糖及0.8％瓊脂之 MS 基本鹽類培養基。

培養環境及植株的誘導

接種之未成熟胚置於26±1℃的恆温黑暗下培養，至第四週後調查癒合組織形成率。再將 U-67及2027-3-5×LY 22-4未成熟胚所誘導的癒合組織於接種後第三週移至分化培養

基，每根試管接種二個癒合組織，置於26±1℃的恆溫，100μE／㎡s光度每日16小時照光下培養，以誘導植物體的分化。

統計分析

各項試驗結果，以百分率表示，其中表1至表8之植株形成率依二項分佈計算95％之信賴介質（confidence limits），圖1及圖2之癒合組織生長則依所測鮮重計算標準偏差（standard deviation），以比較各處理間之差異性。

結　果

癒合組織生長曲線

將U-67自交系未成熟胚誘導的癒合組織，繼代培養於含2mg／1 dicamba之MN-6基本培養基，圖1顯示繼代培養初期癒合組織的鮮重即快速增加，三星期後，癒合組織呈生長緩慢之勢，至第四週已有褐化現象，為了維持癒合組織之生理活性，繼代培養的時間以三星期較為理想。

不同添加物對癒合組織生長的影響

將U-67自交系未成熟胚誘導的癒合組織，繼代培養於含2mg／1 dicamba之MN-6

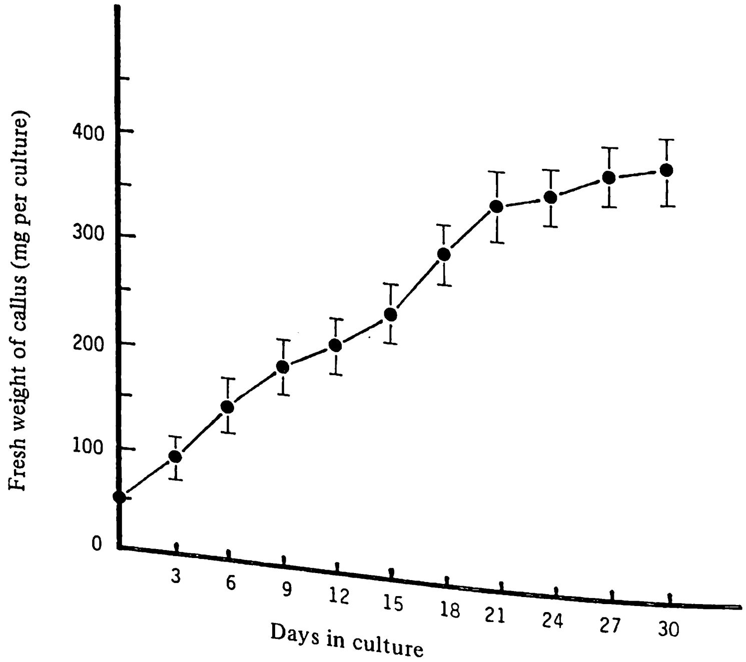

Fig. 1. Growth curve of immature embryo-derived callus of maize inbred U-67. Each point represents the average fresh weight of 15 callus.

基，每根試管接種二個癒合組織，置於26±1℃的恆溫，100μE／㎡s 光度每日16小時照光下培養，以誘導植物體的分化。

統計分析

各項試驗結果，以百分率表示，其中表1至表8之植株形成率依二項分佈計算95％之信賴介質（confidence limits），圖1及圖2之癒合組織生長則依所測鮮重計算標準偏差（standard deviation），以比較各處理間之差異性。

結　果

癒合組織生長曲線

將U-67自交系未成熟胚誘導的癒合組織，繼代培養於含2㎎／l dicamba 之 MN-6 基本培養基，圖1顯示繼代培養初期癒合組織的鮮重即快速增加，三星期後，癒合組織呈生長緩慢之勢，至第四週已有褐化現象，爲了維持癒合組織之生理活性，繼代培養的時間以三星期較爲理想。

不同添加物對癒合組織生長的影響

將U-67自交系未成熟胚誘導的癒合組織，繼代培養於含2㎎／l dicamba 之 MN-6

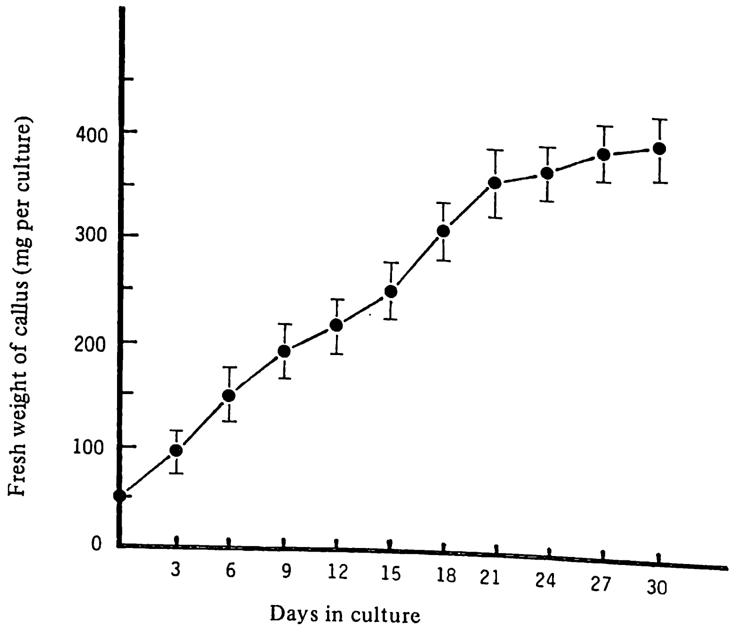

Fig. 1. Growth curve of immature embryo-derived callus of maize inbred U-67. Each point represents the average fresh weight of 15 callus.

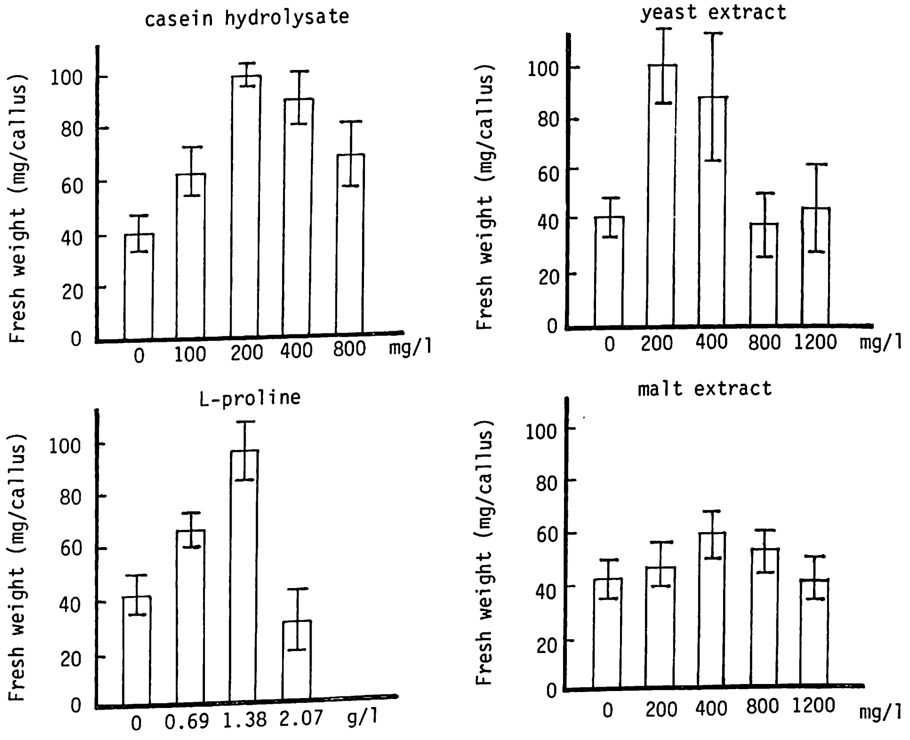

Fig. 2. Influence of varying levels of casein hydrolysate, yeast extract, L-proline and malt extract on the fresh weight of immature embryo-derived callus of maize inbred U-67 after three weeks in culture. Each point represents the average of 15 callus.

基本培養基（不含水解酪蛋白、脯氨酸），並添加圖2所示之四種添加物，三週後調查生長情形，結果發現水解酪蛋白，可明顯增加癒合組織鮮重，其中以200mg／l效果最爲顯著，增高至800mg／ℓ效果反差。200mg／ℓ酵母抽出物亦可促進癒合組織之生長，但過高的酵母抽出物（800mg／l以上）對癒合組織的生長產生抑制作用；而麥芽抽出物在所測試的濃度範圍內對癒合組織之生長影響不大。脯氨酸則以1.38g／l對癒合組織的生長最佳，高濃度的脯氨酸也會對癒合組織的生長產生反效果（圖2）。

植物生長調節劑對植株再生的影響

以U-67自交系而言，不加任何植物生長調節劑之培養，植株再生率可達31%，添加不同濃度NAA／BA, NAA／kinetin組合之植物生長調節劑，對植株再生並無助益（表1,2）。培養基中加入0.2mg／l BA即可使再生率降至10%，而加入0.2mg／l kinetin更可使再生率由35%降至3%。因此，不加任何植物生長調節劑的情況下，對U-67自交系的植株再生最爲有利。培養基中單獨加入BA或kinetin可使綠點（green spot）數增加，在4mg／l NAA下，加入kinetin植株再生率接近0，加入BA則仍有少數再生植株。相同濃度的NAA條件下（0.2或0.4mg／l）加入BA可使葉狀莖（leafy shoot）數增加，但無

Table 1. Effect of concentrations of NAA and BA supplemented to MS medium on the differentiation ability of callus derived from immature embryo of maize inbred U-67

Conc. of NAA (mg/1)	Conc. of BA (mg/1)	No. of callus cultured	Root No.	Root %	Leafy shoot No.	Leafy shoot %	Plantlet No.	Plantlet %	Green spot No.	Green spot %	Browning No.	Browning %
0	0	117	21	18	34	29	36	31 (21-44)	18	15	8	7
0.2	0.5	52	2	4	32	61	1	2 (0-11)	10	19	7	14
0.2	1	26	0	0	15	58	3	12 (2-32)	5	19	3	11
0.2	2	17	0	0	12	70	3	18 (4-44)	2	12	0	0
0.4	0.5	33	0	0	25	76	1	3 (0-16)	3	9	4	12
0.4	1	30	0	0	15	50	4	13 (4-31)	8	27	3	10
0.4	2	22	0	0	16	72	3	14 (3-36)	0	0	3	14
0	0.2	29	1	3	8	28	3	10 (2-28)	14	49	3	10
0	0.5	29	0	0	14	48	2	7 (1-23)	12	42	1	3
0	1	28	2	7	17	61	2	7 (1-24)	7	25	0	0
0	2	33	0	0	14	43	0	0 (0-13)	12	36	7	21

The immature embryo-derived callus were cultured for three weeks. Number in parentheses are 95% confidence limits.

Table 2. Effect of concentrations of NAA and kinetin supplemented to MS medium on the differentiation ability of callus derived from immature embryo of maize inbred U-67

Conc. of NAA (mg/1)	Conc. of Kinetin (mg/1)	No. of callus cultured	Root No.	Root %	Leafy shoot No.	Leafy shoot %	Plantlet No.	Plantlet %	Green spot No.	Green spot %	Browning No.	Browning %
0	0	62	8	13	17	28	22	35 (23-48)	10	16	5	8
0.2	0.5	48	5	10	29	61	7	15 (7-28)	4	8	3	6
0.2	1	34	2	6	12	35	7	21 (9-40)	7	21	6	17
0.2	2	22	4	18	11	50	2	9 (1-29)	5	23	0	0
0.4	0.5	40	2	5	17	42	0	0 (0-9)	14	35	7	18
0.4	1	21	1	5	13	61	0	0 (0-17)	6	29	1	5
0.4	2	20	1	5	7	35	6	30 (12-54)	3	15	3	15
0	0.2	40	3	7	4	10	1	3 (0-14)	24	60	8	20
0	0.5	27	0	0	4	14	5	19 (7-40)	13	48	5	19
0	1	43	0	0	15	35	5	12 (4-27)	19	44	4	9
0	2	34	0	0	9	27	1	3 (0-16)	16	49	8	23

The immature embryo-derived callus were cultured for three weeks. Number in parentheses are 95% confidence limits.

Table 3. Effect of concentrations of NAA and BA supplemented to MS medium on the differentiation ability of callus derived from immature embryo of maize hybrid 2027-3-5 X LY 22-4

Conc. of		No. of callus cultured	Number and percent of callus differentiated									
			Root		Leafy shoot		Plantlet		Green spot		Browning	
NAA	BA											
(mg/1)			No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
0	0	36	15	32	6	17	7	19 (9-38)	3	8	5	14
0.2	0.5	19	5	26	7	36	2	11 (1-32)	2	11	3	16
0.2	1	62	1	2	32	51	5	8 (3-20)	8	13	16	26
0.2	2	75	18	24	14	19	8	11 (5-22)	4	5	31	41
0.4	0.5	16	3	19	6	38	2	13 (2-38)	0	0	5	31
0.4	1	78	17	22	16	20	2	3 (0-10)	26	33	17	22
0.4	2	71	13	18	15	21	6	8 (4-19)	17	24	20	28
0	0.2	67	7	10	17	26	6	9 (4-20)	17	25	20	30
0	0.5	52	11	21	13	25	2	4 (0-14)	16	31	10	19
0	1	59	10	17	20	34	1	2 (0-10)	12	20	16	27

The immature embryo-derived callus were cultured for three weeks. Number in parentheses are 95% confidence limits.

Table 4. Effect of concentrations of NAA and kinetin supplemented to MS medium on the differentiation ability of callus derived from immature embryo of maize hybrid 2027-3-5 X LY 22-4

Conc. of		No. of callus cultured	Number and percent of callus differentiated									
			Root		Leafy shoot		Plantler		Green spot		Browning	
NAA	Kinetin											
(mg/1)			No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
0	0	36	15	42	6	17	7	19 (9-38)	3	8	5	14
0.2	0.5	29	8	28	8	28	1	3 (0-18)	2	7	10	34
0.2	1	52	4	8	17	32	5	10 (3-22)	6	12	20	38
0.2	2	32	6	19	7	22	3	9 (2-26)	2	6	14	44
0.4	0.5	35	7	20	9	26	5	14 (5-32)	4	11	10	29
0.4	1	59	10	17	21	35	5	8 (3-20)	9	16	14	23
0.4	2	92	19	20	15	17	3	3 (1-10)	21	23	34	37
0	0.2	60	18	30	8	13	3	5 (1-15)	14	24	17	28
0	0.5	60	16	26	10	17	4	7 (2-17)	11	19	19	31
0	1	62	16	25	22	36	3	5 (1-15)	9	15	12	19

The immature embryo-derived callus were cultured for three weeks. Number in parentheses are 95% confidence limits.

根的分化；而加入 kinetin 則根分化率增加，植株再生較 BA 差。因此，相同比例的 NAA／BA, NAA／kinetin 對癒合組織分化有不同影響。以2027-3-5×LY 22-4 雜交品系而言，在不加任何植物生長調節劑的培養基，植株再生率較 U-67自交系低，僅19%（表3, 4），加入不同濃度組合的 NAA／BA 及 NAA／kinetin，並不能提高再生率，顯然植物生長調節劑的種類及濃度，並不適合誘導2027-3-5×LY 22-4 植株再生，並且褐化情形較 U-67嚴重。不加 NAA 情況下，雖然加入 kinetin 較 BA 有更多根形成，但不若 U-67自交系反應明顯。因此，不同基因型誘導的癒合組織，對相同比例的 NAA／BA，NAA／kinetin 有不同程度的反應。而 BA, kinetin 對植株再生能力並無效果。由表5結果得知，GA_3刺激癒合組織形成皺葉、捲葉；而0.5mg／l GA_3有促使再生植株形成叢生狀的趨勢。

不同濃度的 dicamba 及2, 4-D 誘導的癒合組織分化能力之影響

不同濃度的 dicamba 及2, 4-D 所誘導的癒合組織，外觀上雖無明顯差異，但其分化能力卻有不同（表6,7）。3mg／l dicamba 所誘導的癒合組織，植株再生率可達30%，隨著 dicamba 濃度的增加，植株再生率明顯下降。當濃度增加至5～7mg／l dicamba 時，褐化率明顯提高，9mg／l時，植株再生率降至4%，大部分癒合組織已褐化，或只形成綠點。而1mg／l 2, 4－D 所大誘導的癒合組織，植株再生率爲26%, 2mg／l 2, 4－D 所誘導的癒合組織，植株再生率則降至16%，癒合組織大多形成葉狀莖及綠點。

不同代數癒合組織分化能力之影響

將 U-67自交系未成熟胚誘導之癒合組織，繼代培養於含2mg／l dicamba, 250mg／l 水解酪蛋白及250mg／l酵母抽出物之 MN-6基本培養基。由表8結果得知癒合組織經一次繼代培養之後，植株再生率爲28%，三次繼培養之後，再生率雖有下降趨勢，但仍能維持20%的分能力。這些癒合組織經二十次繼代培養後之植株分化率仍約可達10%（資料未調

Table 5. Effect of concentrations of GA_3 supplemented to MS medium on the differentiation ability of callus derived from immature embryo of maize inbred U-67

Conc. of GA_3 (mg/1)	No. of callus cultured	Number and percent of callus differentiated									
		Root		Leafy shoot		Plantlent		Green spot		Browning	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
0	91	15	16	26	29	29	32 (23-43)	14	15	7	8
0.5	37	2	5	10	27	0	0 (0-10)	24	65	1	3
1	28	5	18	6	21	0	0 (0-13)	12	43	5	18
2	22	0	0	5	23	1	1 (0-24)	14	63	2	9
4	33	0	0	11	33	0	0 (0-11)	17	52	5	15

The immature embryo-derived callus were cultured for three weeks. Number in parentheses are 95% confidence limits.

Table 6. Effect of dicamba concentrations supplemented to MN-6 medium for callus induction on the differentiation ability of the produced callus cultured on MS medium with 3% sucrose (maize inbred U-67)

Conc. of Dicamba (mg/1)	No. of callus cultured	Number and percent of callus differentiated									
		Root		Leafy shoot		Plantlet		Green spot		Browning	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
3	89	5	6	20	32	27	30 (20-40)	22	25	6	7
5	36	1	3	12	33	5	14 (5-31)	10	28	8	22
7	61	2	3	16	26	5	8 (3-20)	15	25	23	38
9	53	1	2	9	17	2	4 (0-14)	18	34	23	43

10-day old immature embryo were for callus induction and callus were cultured for three weeks for organ differentiation. Number in parentheses are 95% confidence limits.

Table 7. Effect of 2,4-D concentrations supplemented to MN-6 medium for callus induction on the differentiation ability of the produced callus cultured on MS medium with 3% sucrose (mazie inbred U-67)

Conc. of 2,4-D (mg/1)	No. of callus cultured	Number and percent of callus differentiated									
		Root		Leafy shoot		Plantlet		Green spot		Browning	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
1	92	14	15	31	34	24	26 (18-37)	9	10	14	15
2	36	2	6	17	47	6	17 (7-35)	9	25	2	6

10-day old immature embryo were for callus induction and callus were cultured for three weeks for organ differentiation. Number in parentheses are 95% confidence limits.

Table 8. Influence of subculture generation of immature embryo-derived callus on their differentiation ability when cultured on MS medium with 3% sucrose (maize inbred U-67).

Number of generation subcultured	No. of callus cultured	Number and percent of callus differentiated									
		Root		Leafy shoot		Plantler		Green spot		Browning	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
0	90	15	17	25	28	29	32 (23-43)	14	16	7	7
1	67	11	16	12	18	19	28 (21-45)	20	30	5	8
2	40	7	18	15	37	8	20 (10-37)	8	20	2	5
3	46	7	15	10	22	9	20 (10-35)	5	11	15	32

Interval between each successive generation of subculture was three weeks. Number in parentheses are 95% confidence limits.

查，故未列於表8），顯示此種癒合組織是進行細胞養及原生質體分離、再生之極佳材料。而飼料玉米2027-3-5×LY 22-4未成熟胚誘導之癒合組織，經二次繼代培養後大多只形成根的分化，且地上部常發育不良

U-67甜玉米未成熟胚癒合組織分化植株之變異性

由 U-67甜玉米未成熟胚癒合組織所分化約200棵植株，經移植於溫室中種植至成熟（圖3），並經套袋自花授粉後結實（圖4），結果發現許多體細胞突變體（somaclones），明顯的形態變異有植株矮化及早熟（圖5）、皺葉或捲葉、缺少雄穗或雌穗、缺乏葉綠素、雌穗著生於植株頂端（圖6）、雌雄同穗及雄不捻（圖7及8）等個體。

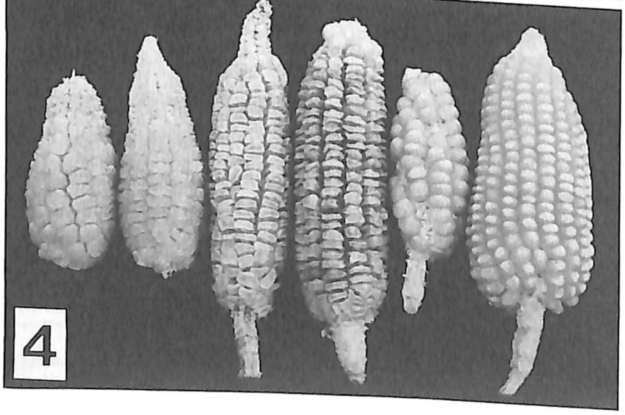

Fig. 3-4. About 200 regenerated plants from immature embryo-derived callus of U-67 were raised to maturity in the green house (3). Kernel mutations were found in regenerated plants of U-67 (4).

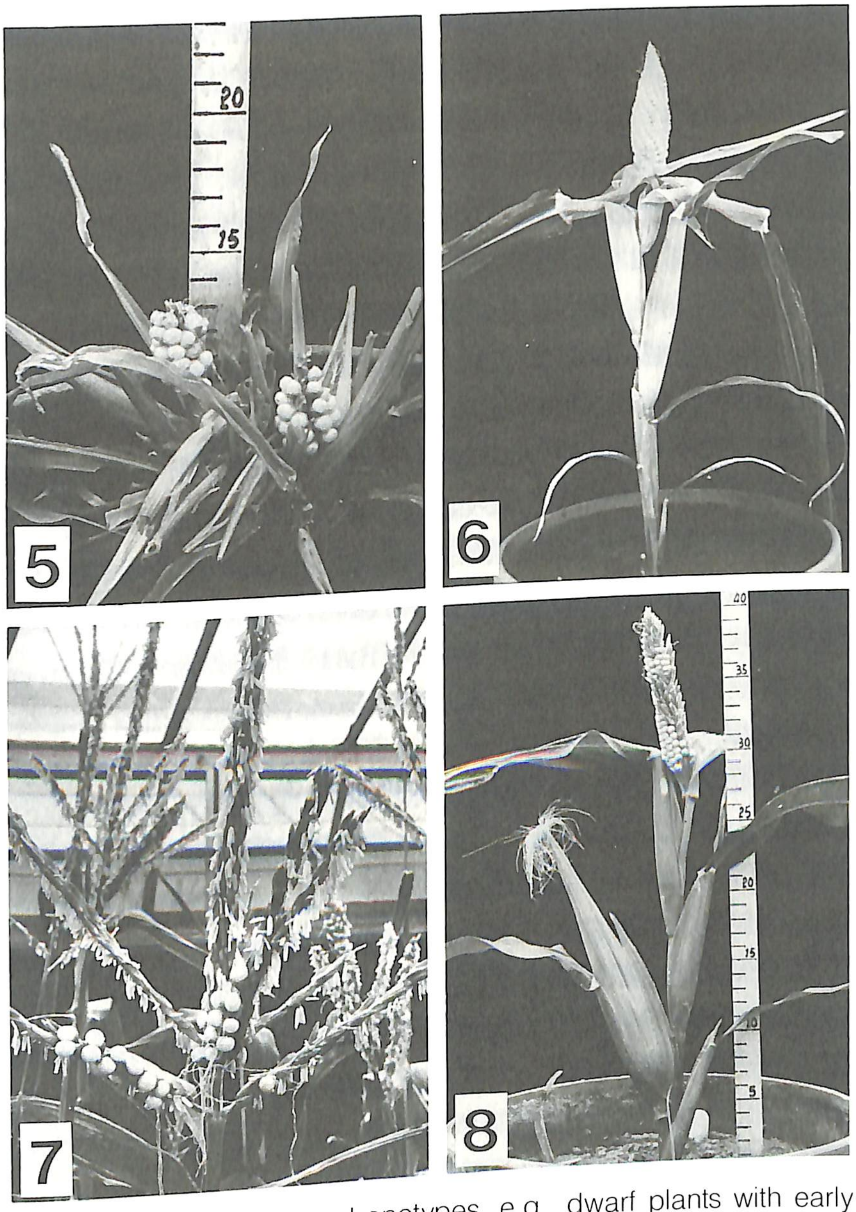

Fig. 5-8. All culture-induced mutants phenotypes, e.g., dwarf plants with early maturity (5), terminal ear (6), development of female flowers in the tassels (tassel seed) (7) and male sterility or absence of tassel (8) were similar to known spontaneous mutations in maize.

討　論

將 U-67自交系未成熟胚所誘導的癒合組織，移至含有2mg / 1 dicamba 的 MN-6 基本培養基中，由圖 1 癒合組織的生長曲線知，培養三星期後，癒合組織生長速率漸趨平緩，

且有褐化現象，已不適宜再繼續培養。因此，癒合組織培養的時間每代以三星期爲宜。於培養基中加入不同附屬添加物，除麥芽抽出物外，水解酪蛋白、酵母抽出物、脯氨酸對維持癒合組織的生長皆有效果（圖2）。Tabata and Motoyoshi （1965）試驗結果認爲酵母抽出物有益於玉米胚乳培養癒合組織之形成。Green et al.（1974）也報導800mg / l酵母抽出物和200mg / l水解酪蛋白，顯著增加玉米成熟胚所誘導癒合組織之鮮重，而麥芽抽出物則無效。在培養基中添加水解酪蛋白雖可增加玉米未成成熟花序癒合組織鮮重（Pareddy and Greyson 1985），但是對癒合組織的形成卻無效（Xu et al. 1984）。Green and Phillips （1975）於MS培養基中加1.98 g / l天門多醯胺（asparagine），可以分離出具有長期再生能力的癒合組織；Stuart and Strickland （1984 a,b）報導苜宿的細胞懸浮培養，於SH培養基中加入50～300mM 脯氨酸可促進體胚形成。Armstrong and Green （1985）報導在 N_6 培養基中加入25mM 脯氨酸可以促進鬆散癒合組織（friable callus）誘導率及體胚的形成，顯然脯氨酸對 embryogenic callus 的誘導及維持居關鍵角色。由於麩氨酸醯胺（glutamine）並不能取代脯氨酸的效果，表示脯氨酸除了作爲有機氮的來源外，尚有其他生理作用。Le et al.（1984）認爲水分逆境（stress）下，植物體內脯氨酸會發生累積的現象，結果引起滲透勢（osmotic potential）降低，而維持細胞膨壓。因此，培養基中加入脯氨酸除了促進癒合組織的生長亦可能扮演滲透調節（osmoregulation）的角色。Gray and Conger （1985）報告指出水解酪蛋白主要成份爲18種游離氨基酸。Dix and Vanstaden （1982）分析麥芽抽出物得知主要由類似 gibberellin 及 IAA 的物質組成。Tabata and Motoyoshi （1965）認爲酵母抽出物最有效的成份爲氨基酸。本試驗結果脯氨酸的效果與水解酪蛋白、酵母抽出物類似。因此推測培養基中加入氨基酸，對於促進癒合組織的生長具有絕對的功效。

禾穀類作物經由組織培養技術，不能獲得大量再生植株的原因，除因培植體及基因型的選擇外，培養亦是一重要決定因素。以雙子葉植物而言，通常僅需一種培養基即可完成癒合組織的誘導及分化；而單子葉植物如水稻誘導 embryogenic callus 形成需要一種培養基，癒合組織的分化則需要第二種培養基（Inoue and Maeda 1981, Siriwardana and Nabors 1983）。因此，對禾穀類作物而言，找尋適當的培養基是組織培養成功與否的重要關鍵。

由 U-67及2027-3-5×LY 22-4未成熟胚誘導的癒合組織，移至含有 NAA / BA, NAA / kinetin 的分化培養基中，探討 auxin 和 cytokinin 類的植物生長調節劑，對癒合組織分化的影響，結果得知 U-67自交系在不加生長調節劑情況下，即能獲得再生植株（表1,2），而2027-3-5×LY 22-4未成熟胚誘導的癒合組織植株再生率則較低（表3,4）。由表1～5結果顯示 NAA / BA, NAA / kinetin 的組合與 GA_3 並不能提高 U-67未成熟胚來源癒合組織的分化率，表示本試驗的成分培養基尚需改進。於 MS 培養基中僅加入0.2mg / l BA，即可使 U-67植株再生率由31％降至10％（表1），0.2mg / l kinetin 使

植株再生率由35％降至3％，且癒合組織大多形成綠點。BA 或 kinetin 對癒合組織分化植株產生負面影響之例並不多見，可能原因是外加生長調節劑，破壞了癒合組織內生荷爾蒙的平衡。同樣的，GA_3的添加亦無法改善癒合組織分化率。Siriwardan and Nabors（1983）認爲 kinetin 對於水稻 embryogenic callus 形成可能不是必要條件，但在分化培養基添加0.5㎎／1 BA 卻能顯著提高植株之再生能力。Abe and Futsufara（1984）報導水稻根培養時，以3㎎／1 2,4-D 所誘導之癒合組織，若以低濃度的2,4-D（0.02㎎／1）配合10㎎／1 kinetin 則能促進植株分化。Skoog and Miller（1957）以菸草爲材料提出 cytokinin 和 auxin 之間比值，可決定器官分化型式的理論，當 cytokinin／auxin 比值低時，可促進根的分化，當 cytokinin／auxin 比值高時，可促進芽的形成。但本試驗結果，相同 NAA 濃度下，增加 BA／NAA、kinetin／NAA 之比值，對植株形成並無助益，而維持相同比值，但增加 NAA、BA、kinetin 的量對植株再生亦無效果。此種結果顯示玉米 embryogenic callus 分化植株之機制和一般癒合組織可經由 auxin／cytokin 之調節達成分化之機制完全不同。Armstrong and Green（1985）將玉米未成熟胚來源的癒合組織，移至含有2％蔗糖的 MS 培養基，在不添加2,4-D 或 cytokinin 類的生長調節劑下，即能再生植株。Duncan et al.（1985）也有相同的結果。Green and Phillips（1975）認爲玉米未成熟胚培養癒合組織之誘導，添加 cytokinin 類植物生長調劑並非必要，且在低濃度的2,4-D 下即能分化成植株。本試驗 U-67自交系在不添加任何植物生長調劑的 MS 培養基中，即能分化成植株。因此，器官的形成可能不是由 NAA／BA、NAA-／kinetin 之比值決定。換言之，並非所有培植體誘導的癒合組織，其器官形成都受這種機制控制。

本試驗 U-67自交系未成熟胚接種於含3或5㎎／1 dicamba 之 MN-6 培養基中，癒合組織形成可達96％或94％，其外觀上亦無明顯差異。但將此癒合組織移至 MS 分化培養基中，測定癒合組織分化能力時，由3㎎／1 dicamba 所誘導的癒合組織，其再生植株的比率約爲30％，顯然高於由5㎎／1 dicamba 所誘導的癒合組織的14％再生率。因此，不同濃度的 dicamba和2,4-D 所誘導的癒合組織，雖然外觀上無明顯差異，但可能因癒合組織內生之植物荷爾蒙，因培養基中外加植物生長調節劑濃度不同，而改變其平衡狀態，表現出不同的分化能力，或因 dicamba 及2,4-D 的殘效影響所致。Gray and Conger（1985）於果園草（orchard grass）的細胞懸浮培養基中，加入 dicamba 與水解酪蛋白可促進體胚的形成。Duncan et al.（1985）報導 dicamba 對玉米成熟胚 embryogenic callus 的誘導及生長，較2,4-D 爲佳，且培養基中加入 dicamba 可降低未成熟胚形成芽及延遲癒合組織褐化，但基因型對2,4-D 及 dicamba 的反應差異很大。Liao and Tsay（1990）報導 3㎎／1 dicamba 對 U-67自交系未成熟胚誘導癒合組織的效果較2, 4-D 爲佳。而本研究發現 3㎎／1 dicamba 所誘導的癒合組織，具有較高的再生率（表6）。Crafts（1964）報告指出 dicamba 爲 chlorobenzoic acid 類的 auxin，較易被代

謝。因此，dicamba 可於植物體內維持較久的活性，所以效果較2, 4-D 爲佳。

本試驗超甜玉米 U-67及飼料玉米2027-3-5×LY 22-4 未成熟胚誘導的癒合組織，外觀上顯著不同，U-67 自交系未成熟胚誘導的癒合組織結構緊密、呈黃色，而2027-3-5×LY 22-4雜交種誘導的癒合組織爲白色，不透明狀。若分別培養於分化培養基，U-67 自交系分化率，顯然高於2027-3-5×LY 22-4。U-67自交系未成熟胚誘導的癒合組織，接種於不含植物生長調節劑之分化培養基即能再生植株，推測 U-67自交系植株的再生很可能經由胚形成途徑。Nabors et al.（1983）試驗結果指出玉米 embryogenic callus 植株再生率約爲 non-embryogenic callus 的33倍。因此欲提高玉米未成熟胚之癒合組織植株再生率，初期誘導 embryogenic callus 的形成是相當重要的。

玉米未成熟胚癒合組織所衍生之植株，產生體細胞變異體的情形，許多報告均曾提及。例如 Earle and Gracen （1985）報導玉米 W182BN 自交系未成熟胚培養可產生成熟期改變、增加或減少株高及穗長、葉色變深、生長勢改變、分蘖增加及穗數增加等變異體。Zehr et al.（1987）則自玉米七個自交系之未成熟胚培養獲得了開花及吐絲期改變，株高、穗長、果粒等性狀之突變體；Prioli et al. （1990）也報導玉米由懸浮細胞及原生質體培養所形成之植株，亦有缺少雄穗或雌穗、雌穗著生於植株頂端、雌雄同穗、短節間等不正常之個體產生。以上許多玉米突變體早期已爲 Neuffer et al. （1968）提及。本研究所產生之變異，亦和上述諸學者所言類似，這些突變種目前是遺傳研究之極佳材料，部份奇特性狀如矮株、早熟等或許將來可供玉米品種改良之用。

誌謝：本研究承國科會經費補助（NSC79－0409－B055－02），農試所玉米研究室提供試驗材料，文稿承台灣大學農藝系賴光隆教授、中興大學農藝系朱德民教授及農試所農藝系劉大江博士斧正，特此申謝。

引用文獻

Abe, T. and Futsufara, Y. (1984) Varietal difference of plant regeneration from root callus tissues in rice. *Japanese J. Breed.* 34:147-155.

Armstrong, C. L. and Green, C. E. (1985) Establishment and maintain of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164:207-214.

Chu, C. C., Wang, C. C., Shun, C. S., Chen, H., Yin, K. C., Chu, C. Y., and Bi, F. Y. (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. *Sci. Sinica* 18:659-668.

Crafts, A. S. (1964) Herbicide behavier in the plant. In: The physiology and bio-chemistry of herbicides. (ed. by Audus, L. J.) pp. 75-110. Academic Press,

New York.

Dix, L. and Vanstaden, J. (1982) Auxin and gibberellin-like substances in coconut milk and malt extract. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 1:239-245.

Duncan, D. R. Williams, M. E., Zehr, B. E., and Widholm, J. M. (1985) The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta* 165:322-332.

Earle, D. D. and Gracen, V. E. (1985) Somaclonal variation in progeny of plants from corn tissue cultures. In: Tissue Culture in Forestry and Agriculture. (ed. by Henke, D. P., Hughes, K. W., Constantin, M. J. and Hollaender, A.) pp. 139-152. Plenum Press, New York.

Gray, D. J. and Conger, B. V. (1985) Influence of dicamba and casein hydrolysate on somatic embryo number and culture quality in cell suspensions of *Dactylis glomerata* (Gramineae). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4:123-133.

Green, C. E., Phillips, R. L. and Kleese, R. A. (1974) Tissue culture of maize (*Zea mays* L.): initiation, maintenance, and organic growth factors. *Crop Sci.* 14:54-58.

Green, C. E. and Phillips, R. L. (1975) Plant regeneration from tissue culture of maize. *Crop Sci.* 15:417-421.

Inoue, M. and Maeda, E. (1981) Stimulation of shoot bud and plantlet formation in rice callus cultures by two-step culture method using abscisic acid and kinetin. *Japanese J. Crop Sci.* 50: 318-322.

Le, R. D., Strom, A. R., Dandekar, A. M., Smith, L. T. and Valentine, R. C. (1984) Molecular biology of osmoregulation. *Science* 224:1064-1068.

Liao, C. K. and Tsay, H. S. (1991) Immature embryo culture of *Zea mays* L. (I) Factors affecting the callus induction. *Chinese Agron. J.* 1:101-113.

Lu, C., Vasil, I. K. and Ozias-Akins, P. (1982) Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. *Theor. Appl. Genet.* 62:109-112.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

Nabors, M. W., Heyser, J. W., Dykes, T. A. and Demott, K. J. (1983) Long-duration, high frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. Planta 157:385-391.

Neuffer, M. G., Jones, L. and Zuber, M. S. (1968) In: The mutants of maize. Crop Science Society of America. Madison, WI. USA.

Pareddy, D. R. and Greyson, R. I. (1985) *In vitro* culture of immature tassels of an inbred field variety of *Zea mays*, cv. Oh 43. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 5:119-128.

Prioli, L. M., da Silva, W. J. and Sondahl, M. R. (1990) Tissue, cell and protoplast culture of maize (*Zea mays* L.). In: Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. (ed. by Nijkamp, H. J. J., Vanderplas, L. H. W. and Van Aartrijk, J.) pp. 38-43, Proc. 7th Intl. Cong. Plant tissue and Cell Culture. Amsterdam, The

Nethelands. June 24-29, 1990.

Siriwardana, S. and Nabors, M. W. (1983) Tryptophan enhancement of somatic embryogenesis in rice. *Plant Physiol*. 73:142-146.

Skoog, F. and Miller, C. O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *In vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol*. 11:118-131.

Stuart, D. A. and Strickland, S. G. (1984a) Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. I. The role of amino acid additions to the regeneration medium. *Plant Sci. Lett*. 34:165-174.

Stuart, D. A. and Strickland, S. G. (1984b) Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa L*. II. The interaction of amino acid with ammonium. *Plant Sci. Lett*. 34:175-181.

Tabata, M. and Motoyoshi, F. (1965) Hereditary control of callus formation in maize endosperm cultured *in vitro*. *Japanese J. Genet*. 40:343-355.

Vasil, V. and Vasil. I. K. (1981) Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum aericanum*, and *P. americanum* X. *P. purpureum* hybrid. *Am. J. Bot*. 68:864-872.

Xu, Z. H., Wang, D. Y., Yang, L. J. and Wei, Z. M. 1984. Somatic embrogenesis and plant regeneration in cultured immature inflorescences of *Setaria italica*. *Plant Cell Rep*. 3:149-150.

Zehr, B. E., Williams, M. E., Duncan, D. R. and Widholm, J. M. (1987) Somaclonal variation in the progeny of plants regenerated from callus cultures of seven inbred lines of maize. *Can. J. Bot*. 65:491-498.

（收稿日期：80年1月24日，接受刊登日期：80年3月22日）